

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

101088750
5000 (19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年8月8日 (08.08.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/061080 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/11, 15/86, C12P 21/02 (74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒101-0032 東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル6階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/00641

(22) 国際出願日: 2001年1月31日 (31.01.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-16746 2001年1月25日 (25.01.2001) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人 農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台二丁目1番地2 Ibaraki (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 中島信彦 (NAKASHIMA, Nobuhiko) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代5丁目16 522棟101号 Ibaraki (JP). 金森保志 (KANAMORI, Yasushi) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代5丁目1-3 ナルシマハイツB棟105号 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL TRANSLATIONAL ACTIVITY-PROMOTING HIGHER-ORDER STRUCTURE

(54) 発明の名称: 新規な翻訳活性促進高次構造

(57) Abstract: It is found out that a specific higher-order structure can be formed in CrPV-like viruses; that translation of protein can be initiated from various amino acids by ligating a reading frame of a gene to the downstream of this higher structure; and that the synthesis of an arbitrary protein from an arbitrary codon can be initiated by changing the combination of base pairs participating in the formation of the higher-structure immediately before the initiation point.

(57) 要約:

CrPV様ウイルス類で特定の高次構造が形成可能のこと、この高次構造の下流に遺伝子の読み枠を連結すると、様々なアミノ酸からタンパク質の翻訳開始が可能のこと、さらに、翻訳開始点直前の高次構造の形成に関する塩基対の組み合わせを変更すると任意のコドンからの任意のタンパク質合成を開始できることを見出して本発明を完成した。

WO 02/061080 A1

明細書

発明の名称

新規な翻訳活性促進高次構造

5

技術分野

本発明は、新規な翻訳活性促進機能を有するRNAの高次構造に関するものである。さらに詳しくは、コオロギ麻痺病様ウイルス類〔Cricket paralysis-like (CrPV-like) viruses〕の外被タンパク質コード領域上流に形成される遺伝子間領域ーリボソーム内部侵入部位 (Intergenic region-Internal Ribosome Entry Site) (IGR-IRES) のRNA高次構造またはその相同構造を構成する塩基配列、およびこれらの配列を利用して異種タンパク質または異種ペプチドを合成する方法に関する。

15

背景技術

リボソームを用いてメッセンジャーRNA (mRNA) を翻訳してタンパク質を合成するとき、メチオニンをコードするAUG翻訳開始コドンが必要とされる。これは、開始コドンを決める働きをする翻訳開始メチオニンtRNAという特殊な翻訳開始専用のtRNA分子が翻訳開始のときに必須とされるためである。従って、従来の組み換えDNA技術を利用したタンパク質合成系では、リボソームを介して生産されるタンパク質やペプチドなどはそのアミノ末端が必ずメチオニンになり、任意のアミノ酸からのタンパク質合成開始は不可能であった。最近になって、メチオニン以外のアミノ酸をアミノ末端に有するタンパク質でも合成可能な報告がある(特表2000-517186号)。これは、メチオニン以外のアミノ酸に対応するアンチコドンを含む変異体イニシエーター

tRNAをコードするDNAを利用する方法である。

一方、昆虫ウイルスのIGR-IRES (Intergenic region-Internal Ribosome Entry Site) を介した翻訳開始では、IGR-IRES自身が高次構造を形成することによって翻訳開始点を決めており、AUG翻訳開始コドンに依存せずにグルタミン（文献2）やアラニン（文献3、4、5、7）から翻訳が始まる。IGR-IRESの構造については、3、側約40塩基についての報告がこれまでになされていた（文献2）が、IGR-IRES全体の構造については不明であった。以前の報告（文献1、6）では、IRES下流に位置する各ウイルスの外被タンパク質遺伝子のコード領域の部分配列も翻訳開始に関与するという結果が得られていたため、メチオニン、アラニン、グルタミン以外のアミノ酸からの翻訳開始は不可能と考えられていた。

15 発明の開示

本発明者は、まずすべてのCrPV様ウイルス類で特定の高次構造が形成されること、この高次構造の下流に遺伝子の読み枠を連結すると、様々なアミノ酸からタンパク質の翻訳開始が可能なこと、さらに、翻訳開始点直前の高次構造の形成に関与する塩基対の組み合わせを変更すると任意のコドンからの任意のタンパク質合成を開始できることを見出して本発明を完成了。

すなわち、本発明の1つの態様は、下記の群より選ばれる塩基配列によって構成される翻訳活性促進機能を保持するRNAの高次構造である；

- 25 ①配列表の配列番号1～7に記載の配列で示される塩基配列、
- ②前記①の塩基配列を含有する塩基配列、
- ③前記①の塩基配列と少なくとも約50%の配列上の相同性を有しつ

翻訳活性促進機能を保持する塩基配列、

④前記①～③の塩基配列の相補鎖、

⑤前記①～④の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする塩基配列、

5 および

⑥前記①～⑤の塩基配列において1ないし数個の塩基の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつ翻訳活性促進機能を保持する塩基配列。

また、本発明の1つの態様は、前記高次構造において、少なくとも P 10 K (シードノット) I、II、および III の構造を保持するRNAの高次構造である。

さらに、本発明の1つの態様は、前記高次構造を保持する塩基配列の何れか一からなるポリヌクレオチドを含有する組換えベクターである。

さらにまた、本発明の1つの態様は、前記組換えベクターで形質転換 15 された形質転換体である。

本発明の別の態様は、前記高次構造を保持する塩基配列のいずれか一からなるポリヌクレオチドを利用する異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法である。

また、本発明の別の態様は、前記ベクターまたは前記形質転換体を利用した異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法である。 20

さらに、本発明の別の態様は、前記ベクターを用いて無細胞タンパク質合成系で実施することを特徴とする異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法である。

さらにまた、本発明の別の態様は、前記ベクターを用いて、コムギ胚芽抽出物を使用する無細胞タンパク質合成系で行うこととする異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法である。 25

またさらに、本発明の別の態様は、AUG翻訳開始コドンを用いない ト

前記いずれかの異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法である。

また、本発明の 1 つの態様は、前記 R N A の高次構造において P K (シュードノット) を構成する塩基対の組み合わせを変更し、該変更された 5 高次構造を保持する塩基配列を利用することを特徴とする任意のコドンから任意の異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成を開始する方法である。

さらにまた、本発明の 1 つの態様は、前記 R N A の高次構造において P K (シュードノット) I を構成する塩基対の組み合わせのうち翻訳開始点直前の 1 組または 2 組以上の塩基対の組み合わせを変更し、該変更された高次構造を保持する塩基配列を利用することを特徴とする任意のコドンから任意の異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成を開始する方法である。

15

図面の説明

図 1 は、 C r P V 様ウイルス類の I G R - I R E S 領域の塩基配列の相同性を示す。

図 2 は、図 1 の続きである。

20 図 3 は、コンピュータプログラム (M F O L D) が予測した二次構造を示す。

図 4 は、 C r P V 様ウイルス類の I G R - I R E S の領域の高次構造が保存されていることを示す。小文字の太字はステム構造形成塩基を、大文字の太字はシュードノットの塩基対形成に関する塩基を意味する。

25 図 5 は、各ステム構造部位の塩基対を示す。小文字の太字はステム構造形成塩基を、大文字の太字はシュードノットの塩基対形成に関する塩基を意味する。

図 6 は、変異導入実験に基づく P S I V の I G R - I R E S の高次構造を示す。小文字の太字はステム構造形成塩基を、大文字の太字はショードノットの塩基対形成に関する塩基を意味する。図中の数字は P S I V ゲノム配列上の塩基の位置、点 (・) はステム構造形成塩基対形成部位、アスタリスク (*) はショードノット構造の形成に関する塩基対形成部位を意味する。

図 7 のうち、上図はプラスミド p T 7 C A T - 5 3 7 5 の構造を示す。下図は、p T 7 C A T - 5 3 7 5 の P S I V 外被タンパク質コード領域の第 1 コドン (C A A : グルタミン) に変異を導入し、20 種類の異なるアミノ酸から翻訳開始を行わせた結果を示す S D S 電気泳動図である。

図 8 は、翻訳開始点直前の高次構造の形成に関する塩基対の組み合わせの変更と、それによるタンパク質の合成開始を示す。

図 9 は、P S I V - I R E S 高次構造により、コムギ胚芽抽出物を用いた無細胞タンパク質合成系において異種タンパク質が発現されることを示す電気泳動図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳しく説明するが、本明細書中で使用されている技術的及び科学的用語は、別途定義されていない限り、本発明の属する技術分野において通常の知識を有する者により普通に理解される意味を持つ。本明細書中では当業者に既知の種々の方法が参照されている。そのような引用されている公知の方法を開示する刊行物等の資料は、それらを引用することにより本明細書中にそれらの全体が完全に記載されているものとして導入される。

(翻訳活性促進機能を保持する R N A の高次構造)

本発明において提供される翻訳活性促進機能を保持する R N A の高次

構造は、配列表の配列番号 1～7 に記載の塩基配列と同一、または実質的に同一な塩基配列を含有する。上記翻訳活性促進機能を保持する R N A の高次構造は、コオロギ麻痺病様ウイルス類 [Cricket paralysis-like (CrPV-like) viruses] の外被タンパク質コード領域上流に形成される R 5 N A 高次構造 (IGR-IRES) またはその相同構造を構成する塩基配列で構成される。塩基配列が、配列表の配列番号 1～7 に記載の塩基配列と全く同一でなくとも、配列表の配列番号 1～7 に記載の塩基配列で構成される R N A の高次構造と同様の高次構造が保持されている限りは、翻訳活性促進機能は保持される。また、翻訳活性促進機能を保持するためには、少なくともシュードノット (Pseudoknot、PK) I、II、および III 10 の構造 (塩基対形成に基づく結び目構造) を保持する R N A の高次構造を構成する塩基配列が存在する必要がある。なお、コオロギ麻痺病様ウイルス類とは、P S I V (Plautia stali intestine virus)、H i P V (himetobi P virus)、D C V (Drosophila C virus)、C r P V (Cricket 15 paralysis virus)、T r V (Triatoma virus)、B Q C V (black queen-cell virus)、R h P V (Rhopalosiphum padi virus) 等が例示される。上記ウイルス類の塩基配列については、文献 8～15 にそれぞれ報告がなされている。

配列表の配列番号 1～7 に記載の塩基配列と実質的に同一の塩基配列 20 としては、例えば、配列番号 1 に記載の塩基配列と約 50% 以上、好ましくは約 70% 以上、より好ましくは約 80% 以上、さらに好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。そして、これら配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列と実質的に同一な塩基配列は、少なくとも PK (シュードノット) I、II、および III 25 の構造またはその相同構造を維持していることが必要である。配列表の配列番号 2～7 に記載の塩基配列についても、同様の例示を挙げることができる。

塩基配列の相同性を決定する技術は自体公知であり、これを広く利用して、上記相同性を有する塩基配列を決定可能である。

さらに、このように特定された塩基配列をもとにして、1以上、例えば1～30個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個、特に好ましくは1ないし数個、の塩基の欠失・置換・付加あるいは挿入といった変異を有する塩基配列も提供される。欠失・置換・付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、またはポリメラーゼ連鎖增幅法（PCR）を単独または適宜組み合わせて、例えばサムブルック等編〔モレキュラーコローニング、アラボラトリーマニュアル 第2版〕コールドスプリングハーバーラボラトリー、1989、村松正實編〔ラボマニュアル遺伝子工学〕丸善株式会社、1988、エールリッヒ、H.E.編〔PCRテクノロジー、DNA增幅の原理と応用〕ストックトンプレス、1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばUlmerの技術（Science、219、666、1983）を利用することができる。変異が導入されたいずれの塩基配列も少なくともPK（シュードノット）I、II、およびIIIの構造またはその相同構造を維持していることが必要である。

本発明の一つの態様において、翻訳活性促進機能を保持するRNAの高次構造を構成する塩基配列は、上記した塩基配列の相補鎖も意味する。そして、それらの相補鎖が、少なくともPK（シュードノット）I、II、およびIIIの構造またはその相同構造を維持していることが必要である。

本発明の別の態様において、翻訳活性促進機能を保持するRNAの高次構造を構成する塩基配列は、上記した塩基配列の対応する領域にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドでありうる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えばサムブルック等編〔モレキュラーコローニング、アラボラトリーマニュアル 第2版〕コール

ドスプリングハーバーラボラトリー、(1989)等に従うことができる。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は一般に知られたものであるが、その一例としては、50%ホルムアミド、5×SSC (150 mM NaCl、15 mM クエン酸三ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.6)、5×デンハーツ溶液、10%デキストラン硫酸、および20 μg/ml の変性剪断サケ・精子DNAを含む溶液中、42°Cで一晩、次いで、約65°Cにおいて0.1×SSC 中での洗浄といった条件であってもよい。これらの塩基配列は目的の高次構造を維持する限りは、上記した塩基配列にハイブリダイズするものであれば必ずしも相補的配列でなくともよい。例えば、配列表の配列番号1～7に記載の塩基配列またはその相補的配列に対する相同性が、例えば少なくとも約40%、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上のものであってもよい。

上記RNAの高次構造は、同種のタンパク質またはポリペプチドのみならず、異種のタンパク質またはポリペプチド等の製造において、これらの翻訳を開始および促進するため、非常に有用である。ここで、同種とは上記RNAの高次構造の由来である昆虫ウイルスを意味し、異種とは昆虫ウイルス以外の生物種を意味する。該RNAの高次構造を構成する塩基配列は、例えば公知のベクターに挿入し、宿主細胞に導入して、公知のタンパク質発現系において異種タンパク質または異種ポリペプチドなどの合成に利用できる。また、該RNAの高次構造を構成する塩基配列を含有するベクターを利用して、無細胞タンパク質発現系(文献16)において異種タンパク質または異種ポリペプチドなどを合成することができる。下記実施例に示したように、上記RNAの高次構造は、昆虫ウイルス由来の構造であるが、その翻訳開始機能は家兎網状赤血球ライセート中においても有効である(図8を参照)。さらに、動物由来の翻

訳系だけではなく、植物由来の翻訳系であるコムギ胚芽抽出物中においても有効である。(図9を参照)。

ベクターの構築は、自体公知の手段が応用され、例えばレブリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して行われる。形質転換のより好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法であるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系の利用である。ベクターは、選択した宿主または発現系の種類により選別され、発現目的とする異種または同種の遺伝子と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子とを構成要素とする。上記RNAの高次構造を構成する塩基配列は、発現目的とする同種または異種の遺伝子の翻訳領域直前に挿入することが好ましい。また、複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子は、原核細胞か真核細胞かによって選別され、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー、マーカー配列、転写配列、非翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナルや、さらにmRNAを安定化し得る5'および3'非翻訳配列等を自体公知の方法によって組合せて利用できる。

また、翻訳されたタンパク質を、小胞体内腔、ペリプラスミックスペースまたは細胞外環境へ分泌させるために、適当な分泌シグナルを発現するタンパク質に組み込むことができる。これらのシグナルはタンパク質に本来的なものであってもよく、あるいは異種性のシグナルであってもよい。

ベクターとしては、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パボバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病

ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、ならびにそれらを組み合わせたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等が挙げられる。

5 適当な宿主の代表的なものとしては、細菌細胞、例えば連鎖球菌属 (streptococci)、ブドウ球菌属 (staphylococci)、大腸菌 (E.coli)、ストレプトミセス (Streptomyces) および枯草菌 (Bacillus subtils) 細胞；真菌細胞、例えば酵母細胞およびアスペルギルス属 (Aspergillus) 細胞；昆虫細胞、例えばドロソフィラ S 2 (Drosophila S2) およびスドロテラ S f 9 (Spodoptera Sf9) 細胞；動物細胞例えば C H O 、 C O S 、 H e L a 、 C 1 2 7 、 3 T 3 、 B H K 、 2 9 3 およびボウズ (Bows) メラノーマ細胞；ならびに植物細胞等が挙げられる。

10 15 ベクターを宿主に導入することによる形質転換は、自体公知の方法により行うことができる。さらに、該ベクターが導入された形質転換体を、自体公知の各々の宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養し、培養細胞中で生産された、あるいは培養上清中に分泌されたタンパク質またはポリペプチドなどを自体公知の方法で回収することにより、目的とする異種タンパク質または異種ポリペプチドなどが得られる。

20 25 本発明の態様の一つである異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法は、上記 R N A の高次構造を構成する塩基配列を、翻訳を開始および促進する塩基配列として利用することを特徴とする。該合成方法は、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術であっても、または自体公知の無細胞タンパク質合成法であってもよい。本発明の実施例においては、家兎網状赤血球ライセート、またはコムギ胚芽抽出物をリボソーム源として使用する無細胞タンパク質合成法を利用してタンパク質合成を確認したが、これらに限定

されるものではない。

従来の遺伝子工学的手法においては、タンパク質を合成するときメチオニンをコードする A U G 翻訳開始コドンが必要であり、得られる蛋白質はそのアミノ末端がメチオニンからなるものであったが、上記 R N A の高次構造を利用することにより、A U G 翻訳開始コドンを用いなくても、翻訳第 1 コドンがいずれのアミノ酸をコードする塩基配列であっても翻訳を開始することができる。すなわち、上記 R N A の高次構造を利用すれば、アミノ末端が任意のアミノ酸からなるタンパク質の合成が可能になる。

10

また、上記 R N A の高次構造のうち、P K を構成する塩基対の組み合わせ、特に P K I を構成する塩基対であって翻訳開始点直前の塩基対の組み合わせ、の 1 組または 2 組以上を変更すると、任意のコドンから任意のタンパク質合成が開始できる。変更する塩基対の組み合わせが 2 組以上であるとき、該塩基対の組み合わせは、連続して存在する組み合わせであってもよいし、不連続であってもよい。例えば、P S I V の P K I の翻訳開始点直前の高次構造を c a c u u から c a c c c に改変したところ、改変前のプラスミドでは翻訳されなかつた異種タンパク質である G F P の翻訳がなされた。すなわち、野生型の I G R - I R E S では翻訳できない異種遺伝子からタンパク質を翻訳するには、P K を構成する塩基対の組み合わせ、特に P K I を構成する塩基対であって翻訳開始点直前の塩基対の組み合わせ、を変更すればよい。上記のような塩基対の組み合わせが変更された R N A の高次構造は、少なくとも P K (シュードノット) I, II, および III の構造またはその相同構造を維持していることが必要である。

実施例

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

(実施例 1)

5 CrPV様ウイルス類（文献8）のIGR-IRES領域の塩基配列をコンピュータープログラム CLUSTAL Wで整列させたところ、図1および図2に示したような一次構造上の相同性が得られた。図1および図2中、黒線で囲んだ領域は、保存されている配列を表す。しかし、この方法ではIRESの機能に重要な役割を果たす相補配列に関する保存性は検出できなかった。さらに、CrPV様ウイルス類の一種のPSIVのIGR-IRES領域を二次構造予測プログラム MFOLDで予測した結果を図3に示す。この方法でも、IRESの機能に重要な役割を果たす相補配列に関する保存性は検出できなかった。そこで、CrPV様ウイルス類のIGR-IRES領域の共通性や機能的に重要な構造に関する情報を得るために、変異導入実験を後述する方法で行った。まずシステム・ループ構造、シードノット構造（塩基対形成に基づく結び目構造）における塩基を変異させ、それによるタンパク合成との関係を確認することにより高次構造を検討した。その結果、図4～図6に示すようにIGR-IRESの機能に重要な部分を抽出して塩基配列を整列させると、すべてのCrPV様ウイルス類で図5および図6に示した高次構造が形成可能であった。各ウイルスで、4本のシステム・ループ構造（STIII、STIV、STV、STVI）、3個のシードノット構造（PKI、PKII、PKIII）の形成が確認された。この高次構造のなかで3個のシードノット構造を欠失させると、翻訳は起きなかつた。また、翻訳開始点よりも下流の塩基配列はIGR-IRESの高次構造には関与していないことが判明した。これは、以前の報告（文献1、6）で下流に異なる遺伝子を導入した場合に翻訳が阻害された原因は、IGR-I

R E S の高次構造の形成を阻害するような配列が挿入されたためであるということを示唆する。以上の結果から、3個のシュードノット構造を含む高次構造が、タンパク質の翻訳開始および促進に寄与することが判明した。

5

(実験例 1)

該高次構造の下流に遺伝子の読み枠を連結してタンパク質の翻訳を行うと、様々なアミノ酸からタンパク質の翻訳が開始された(図7)。つまり翻訳第1コドンを変更してもタンパク質の合成開始が可能であり、全20アミノ酸に対応するいずれのコドンが翻訳第1コドンであってもタンパク質が合成された。

次に、上記変異導入実験で用いたプラスミドと同じものを使用し、ウイルス外被タンパク質遺伝子の代わりに、ルシフェラーゼ遺伝子とクラゲの緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子をa u g翻訳開始コドンを欠落させた上でPKIIIの直下に挿入し、後述する方法で発現させた(図8)。野生型のIGR-IRESの下流からルシフェラーゼ遺伝子は翻訳されたがGFP遺伝子は翻訳されなかった。これを改良する目的で、IGR-IRESの配列の一部であるPKIの塩基配列を野生型のc a c u u(図8のAの左)からc a c c c(図8のAの右)に改変したところ、GFP遺伝子を翻訳させることが可能になった。かくして翻訳開始点直前の高次構造の形成に関与する塩基対の組み合わせを変更することで、任意のコドンから任意のタンパク質の合成を開始する方法(第8図)を確立した。なお、図8のB中、レーン1. BMVは、プロモモザイクウイルスRNAを意味する。レーン2. pT7CAT-5375は、発現タンパク質が外被タンパク質で開始コドンがCAA(Gln)のプラスミドを意味する。レーン. pIRES-Lucは、PKIが野生型・発現タンパク質がルシフェラーゼ・a u g欠落のプラスミドを意味する。

レーン4. p I R E S - G F P は上記3. の発現タンパク質が G F P の場合であり、レーン5. p I R E S' - L u c とは、P K I が変異型・発現タンパク質がルシフェラーゼ・a u g 欠落のプラスミドを意味する。レーン6. p I R E S' - G F P は上記5. の発現タンパク質が G F P の場合であり、レーン7. R N A 無添加はコントロールである。また、L u c とはルシフェラーゼ、C A T はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、G F P は緑色蛍光タンパク質を意味する。

実験は以下のように行った。

(変異プラスミドの構築)

10 ベクターとしてプラスミド p T 7 C A T - 5 3 7 5 を使用した。p T 7 C A T - 5 3 7 5 は、文献1に記載されているように、大腸菌のファージに由来する T 7 R N A ポリメラーゼが認識するプロモータ配列の下流にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) 遺伝子を挿入し、さらにその下流に本発明からなる高次構造を保持する各塩基配列 (翻訳促進配列) と適当なタンパク質をコードする遺伝子とを接続したベクターである (特許第3002724号を参照)。ここではタンパク質をコードする遺伝子として P S I V 外被タンパク質遺伝子を使用した。このプラスミドから T 7 R N A ポリメラーゼで R N A を合成し、その R N A を用いて家兎網状赤血球ライセートで *i n v i t r o* 翻訳を行った。その翻訳産物を S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。

なお、変異断片の増幅は、変異配列を含む合成D N A プライマーと厳密性の高いD N A ポリメラーゼ (K O D D a s h : 東洋紡株式会社) を用いて行い、増幅された断片は、アガロース電気泳動で精製し、次いでリン酸化し、自己ライゲーションさせ、大腸菌 (E.coli) に形質転換した。ヌクレオチドの置換はD N A シーケンシングで確認した。ステムループIIIのらせん部分の削除と置換はフェュージョンP C R (文献17) で行つ

た。ヌクレオチド(nt) 6051-6061を欠失させるために、P S I V配列のnt 6029-6050とnt 6062-6080を含むフォワードプライマー(GGTTAAATTCAGGTAAAAAAATTGCTATA)とpT7Blue (Novagen社)のnt 27-5を含むリバースプライマーを初期増幅のため合成した。次に、nt 6028-6018を削除するためP S I V配列のnt 6043-6029とnt 6017-5998を含むリバースプライマー(CCTCGAAATTAACCAGATCACATAGTCAGCTTC)とpT7Blue (Novagen社)のnt 28-47を含むフォワードプライマーを別の初期増幅のため合成した。これら2つのプライマーの下線部はフュージョンPCRの15 nt オーバーラップを示す。この二つのプライマーセットを使った個々の初期増幅の後、その二つの増幅DNA断片を混合し、文献17の記載に従って融合した。最終増幅はpT7Blueのnt 28-47とnt 27-5を担持するプライマーを使って実行し、次いでこの増幅されたDNA断片をゲルで精製し、リン酸化し、そしてライゲーションさせた。らせん部分を置換するためには、置換ヌクレオチドを含むより長いプライマーを使用して初期増幅を行った。

(変異P S I V-IRESによる *in vitro* 翻訳分析)

プラスミドDNAは、P S I Vゲノムの外被タンパク質コード領域のnt 7096のところで、大腸菌 (E.coli) 由来の制限酵素、Eco RIで直鎖化した。この直鎖状にしたDNAは、Ribo-MAX large-scale RNA production system (Promega社) を使いT7RNAポリメラーゼで転写した。翻訳産物を標識するために Biotin in vitro Translation Kit (Roche Molecular Biochemicals社) を使用した。蒸留水中に溶解したRNAを68°Cに加熱後、氷で冷やし、次いで家兎網状赤血球ライセトと混合した。RNA終濃度は、compensatory mutation analysisを行うときに4 μg/mlとなるよう調整した。欠失分析の場合は、翻訳さ

れた外被タンパク質の少量を検出のため、RNA濃度を $1.6\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ に増加させた。ビオチン標識されたタンパク質はSDS-ポリアクリルアミド(12%)ゲル電気泳動で分離してPVDF膜上に転写し、そして ECL Western Blotting Detection Reagents(Amersham Pharmacia Biotech社)を用いて検出した。

(実験例2)

リボソーム源として市販のコムギ胚芽抽出液(Promega社)を用い、文献18および19に記載の方法に準じて無細胞タンパク質合成反応を行った。プラスミドは実施例1で使用したものと同じものを使用した。ルシフェラーゼ遺伝子またはクラゲGFP遺伝子は、ウイルス外被タンパク質遺伝子の代わりに、*a u g*開始コドンを欠落させた上で、実施例1と同様にプラスミドのPKIIIの直下に挿入した。また、大腸菌由来のジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子は、プラスミドのT7プロモーター配列直下に改変PSIV-IRESを挿入したさらにその直下に、AUGコドンを欠落させた上で挿入した。使用した改変IRESは、nt6006-6007をacからggに、nt6070-6071をguからccに、nt6165のgをcに、nt6190のcをgに変異させたものである。各遺伝子について構築したプラスミドから、実施例1と同様に鋳型RNAを発現させた。これら各鋳型RNA(終濃度は $0.25\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$)と10pmolのビオチン化リシリルtRNA(Roche Molecular Biochemicals社)とを、市販のコムギ胚芽抽出液反応液(25 μL)に加え、23°Cで2時間の翻訳反応を行った。コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質翻訳反応に使用する試薬および条件は文献18および19に準じた。その後、実施例1と同様の方法で翻訳産物の検出を行った。その結果を図9に示す。図9中、レーン1は図8のレーン6に使用したRNAと同一のRNA、pIRES'-GFPを、レー

ン2は図8のレーン5に使用したRNAと同一のRNA、pIRES
-Lucを使用したタンパク質合成の結果である。また、レーン3は、
上記のように調製したAUGコドンを欠くDHFR遺伝子を使用した結果
を示す。レーン4は、RNA無添加コントロールである。図9から明らかなように、改変PSIV-IRESを利用して、家兎網状赤血球ライセート中のみならず、コムギ胚芽抽出物を用いた無細胞タンパク質合成系においても、AUGコドンから始まらない異種タンパク質遺伝子の翻訳、すなわち、任意のアミノ酸から始まる異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成を行うことができた。

参考文献

文献 1 : Sasaki J & Nakashima N. (1999) J Virol. 73, 1219-1226.

文献 2 : Sasaki J & Nakashima N (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 1512-1515.

5 文献 3 : RajBhandary (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 1325-1327.

文献 4 : Willson et al. (2000) Mol. Cell. Biol. 20, 4990-4999.

文献 5 : Wilson et al. (2000) Cell, 102, 511-520.

文献 6 : Domier et al. (2000) Virology, 268, 264-271.

10 文献 7 : McCarthy JEG (2000) Cur. Biol. R715-717.

文献 8 : van Regenmortel (2000) VIRUS TAXONOMY. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press , SanDiego pp 1162, p678-683.

文献 9 : Sasaki J. et al. (1998) Virology 244, 50-58.

15 文献 10 : Nakashima N. et al (1999) Arch. Virol. 144, 2051-2058.

文献 11 : Johnson KN & Christian PD (1998) J. Gen. Virol. 79, 191-203.

文献 12 : Wilson JE. et al. (2000) Mol. Cell. Biol. 20, 4990-4999.

文献 13 : Czibener C. et al. (2000) J. Gen. Virol. 81, 1149-1154.

20 文献 14 : Leat N et al. (2000) J. Gen. Virol. 81, 2111-2119.

文献 15 : Moon JS. et al. (1998) Virology 243, 54-65.

文献 16 : Nature 179, 160-161 (1957)

文献 17 : Virology 214, 611-618 (1995)

文献 18 : Endo Y. et al. (1992) J. Biotech. 25, 221-230.

25 文献 19 : Madin K. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 559-

産業上の利用の可能性

以上説明したように本発明により、翻訳促進機能を有する一定の高次構造を構成する塩基配列、および該塩基配列を用いて、異種タンパク質または異種ポリペプチドを開始コドンに束縛されることなく（A U G 開始コドンを含むことなく）合成可能とする方法が提供された。本発明は、異種タンパク質またはポリペプチドの遺伝子組換え技術を利用した合成技術において大きな有用性を提供し、タンパク質の合成や構造解析などの基礎研究、ならびその応用としての医薬の開発・生産に至る広い分野に極めて多大に寄与するものである。

請求の範囲

1. 下記の群より選ばれる塩基配列によって構成される翻訳活性促進機能を保持するRNAの高次構造;
 - 5 ①配列表の配列番号1～7に記載の配列で示される塩基配列、
 - ②前記①の塩基配列を含有する塩基配列、
 - ③前記①の塩基配列と少なくとも約50%の配列上の相同性を有しかつ翻訳活性促進機能を保持する塩基配列、
 - ④前記①～③の塩基配列の相補鎖、
 - 10 ⑤前記①～④の塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイゼーションする塩基配列、
および
 - 15 ⑥前記①～⑤の塩基配列において1ないし数個の塩基の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつ翻訳活性促進機能を保持する塩基配列。
2. 請求の範囲第1項の高次構造において、少なくともPK(シュードノット)I、II、およびIIIの構造を保持するRNAの高次構造。
3. 請求の範囲第1項または第2項に記載の高次構造を保持する塩基配列の何れか一からなるポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
- 20 4. 請求の範囲第3項に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
5. 請求の範囲第1項または第2項に記載の高次構造を保持する塩基配列のいずれか一からなるポリヌクレオチドを利用する異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法。
- 25 6. 請求の範囲第3項に記載の組換えベクターまたは請求項4に記載の形質転換体を利用した異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法。

7. 請求の範囲第3項に記載のベクターを用いて無細胞タンパク質合成系で実施することを特徴とする異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法。
8. 前記無細胞タンパク質合成系が、コムギ胚芽抽出物を用いて行うものである請求の範囲第7項に記載の異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法。
9. AUG翻訳開始コドンを用いない請求の範囲第5項から第8項に記載のいずれか一の異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法。
10. 10. 請求の範囲第2項に記載のRNAの高次構造においてPK(シードノット)を構成する塩基対の組み合わせを変更し、該変更された高次構造を保持する塩基配列を利用することを特徴とする任意のコドンから任意の異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成を開始する方法。
15. 11. 請求の範囲第2項のRNAの高次構造においてPK(シードノット)Iを構成する塩基対の組み合わせのうち翻訳開始点直前の1組または2組以上の塩基対の組み合わせを変更し、該変更された高次構造を保持する塩基配列を利用することを特徴とする任意のコドンから任意の異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成を開始する方法。

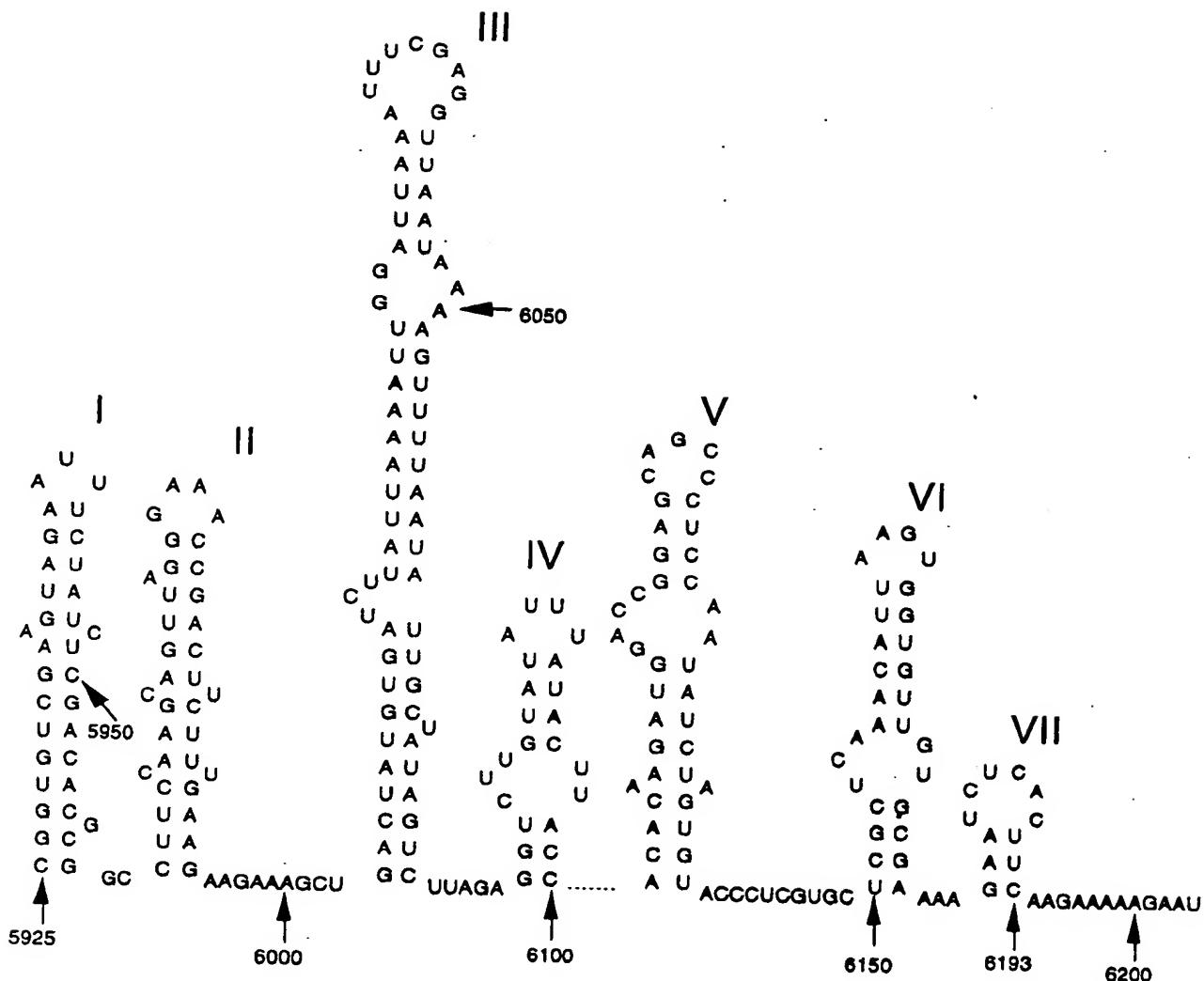
要約書

C r P V 様ウイルス類で特定の高次構造が形成可能のこと、この高次構造の下流に遺伝子の読み枠を連結すると、様々なアミノ酸からタンパク質の翻訳開始が可能のこと、さらに、翻訳開始点直前の高次構造の形成に関する塩基対の組み合わせを変更すると任意のコドンからの任意のタンパク質合成を開始できることを見出して本発明を完成した。

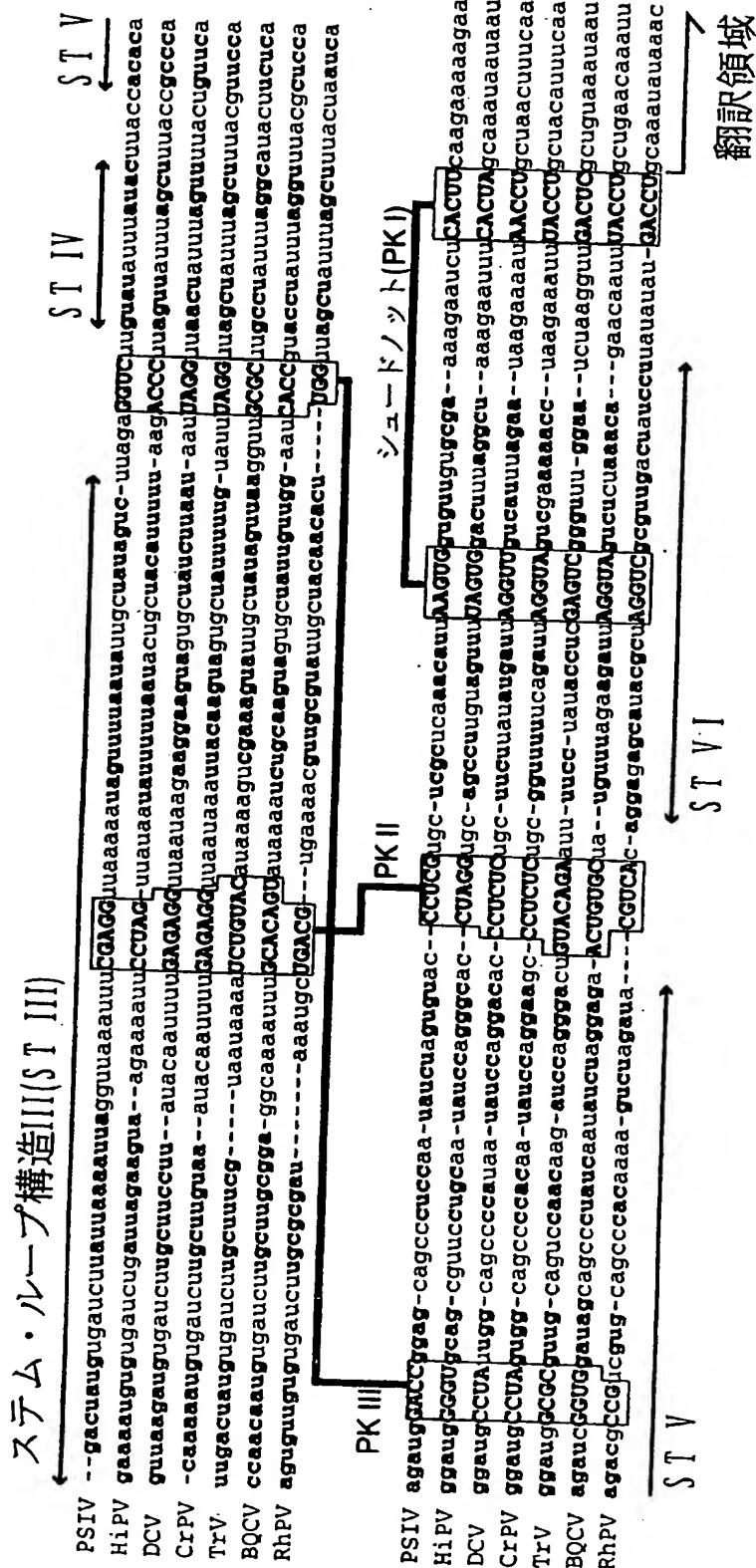
1

☒ 2

図3



☒ 4



5

ST VI

6150 *ucgc* u c a
agg u g u a
6178 u . c
6163 g . a
g u u u /
U G A

u	u	STIV
a	u	
u	a	
6084	a.u	6096
	u.a	
	g.c	

STV
 ac CAG - 6111 a
 gagg guaga caca
 g ::::: ::::: 6119
 c cucc uaucu gugu
 c c a a a

図 6

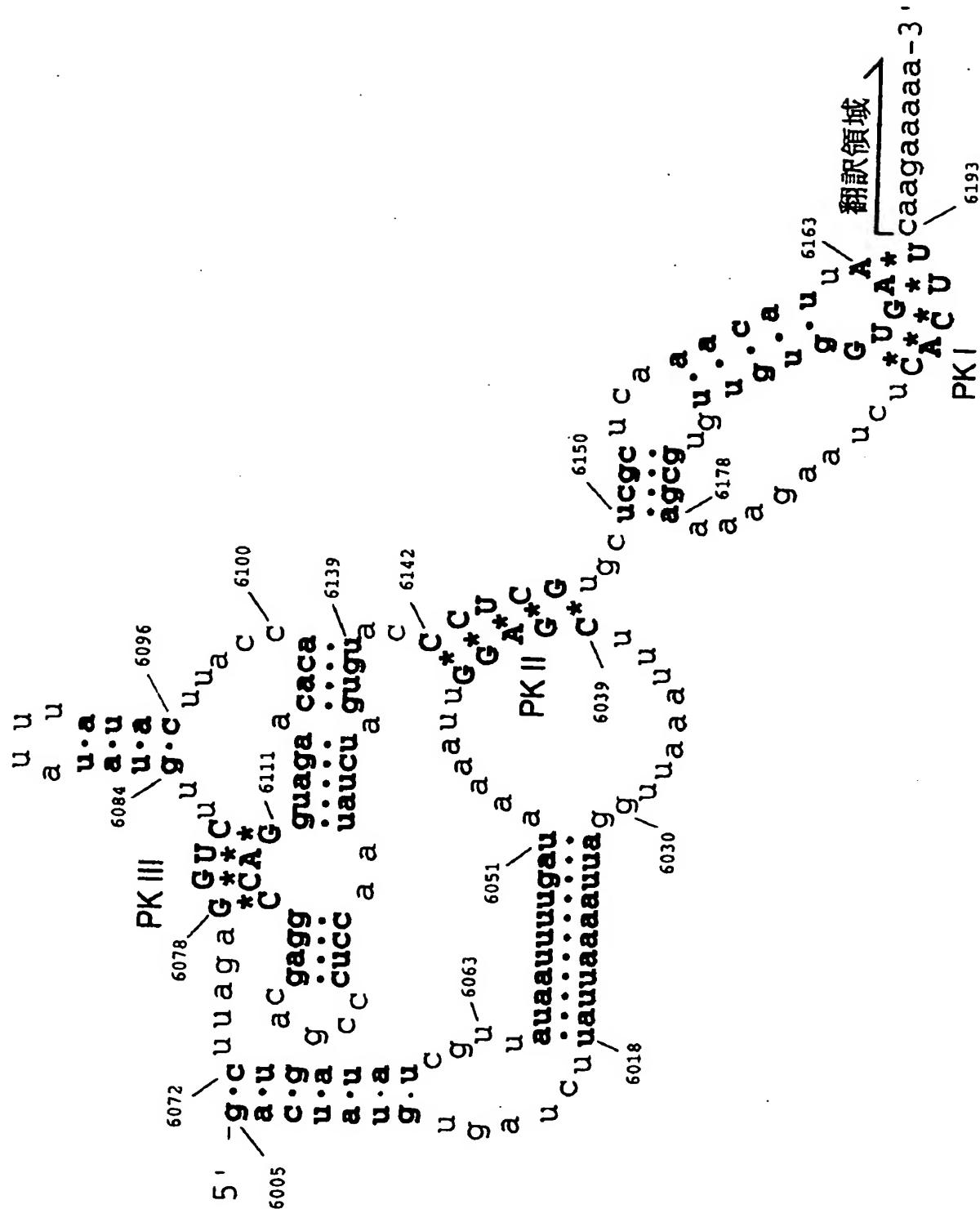
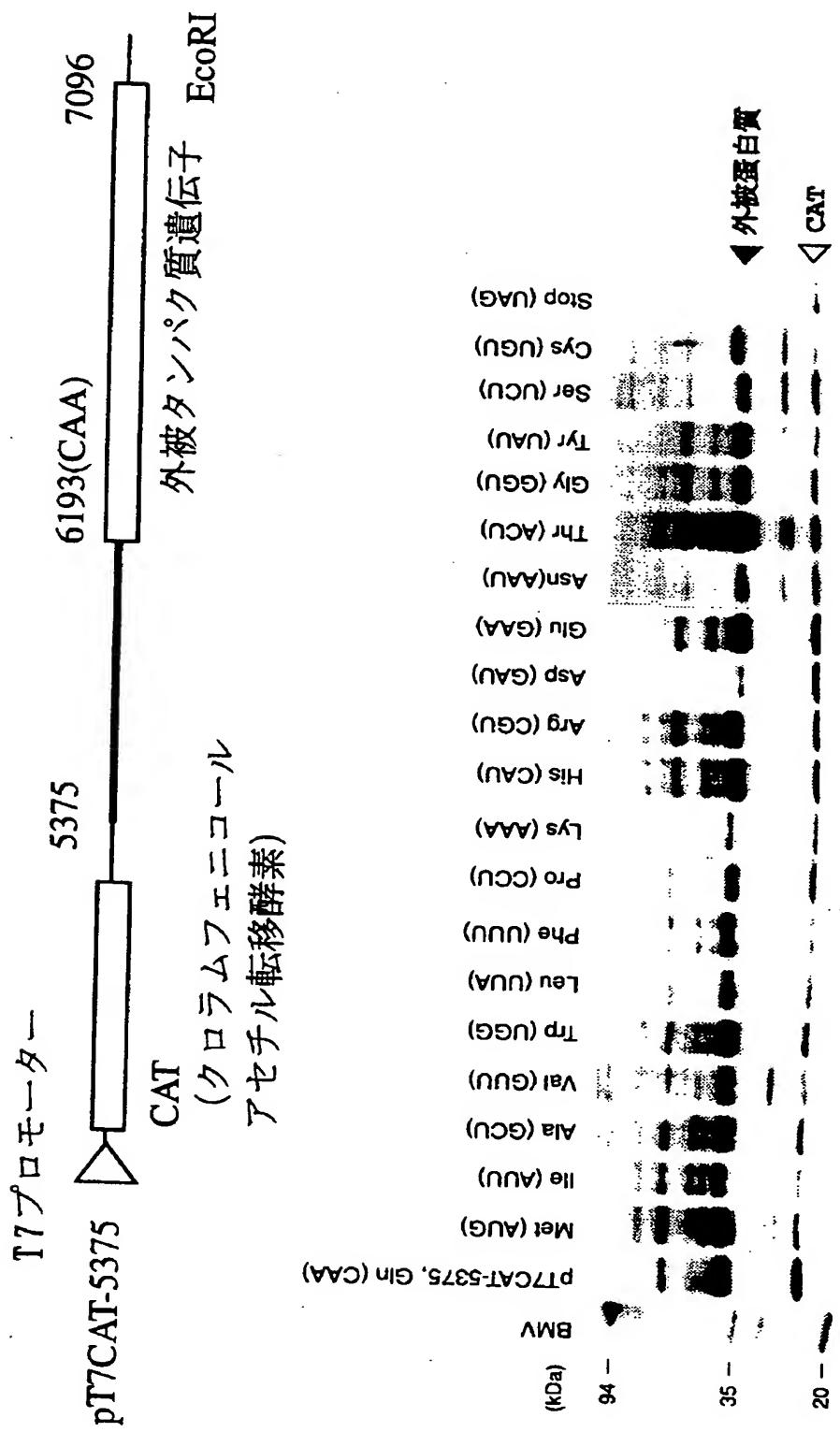
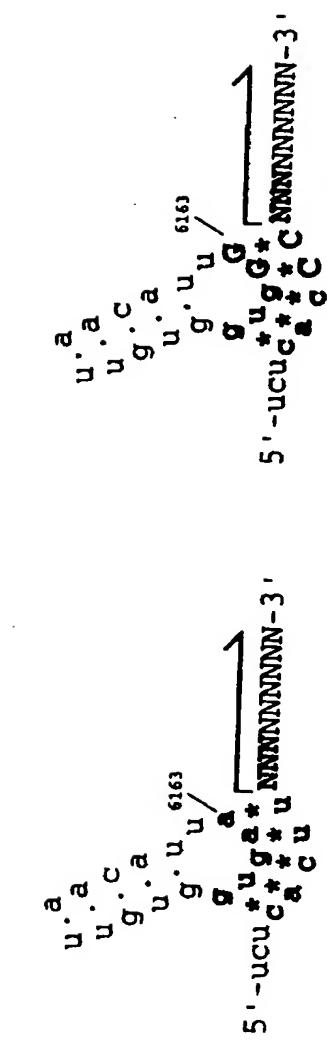


図 7



8



IREES (野生型)

IMES' (改良型)

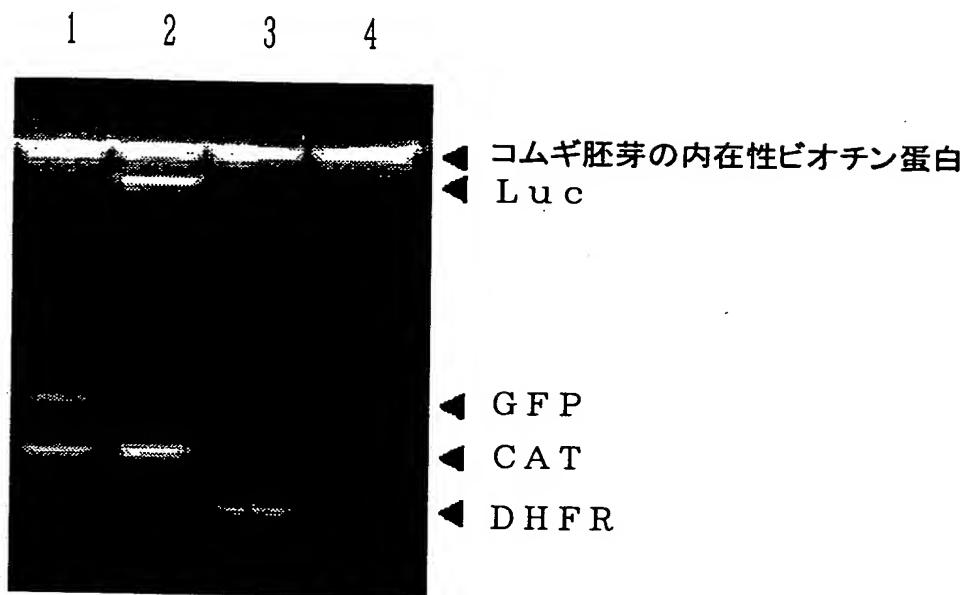
1

2

1 2 3 4 5 6 7

1. プロモモザイクウイルスRNA
2. pT7CAT-5375
3. pIRES-Luc
4. pIRES-GFP
5. pIRES'-Luc
6. pIRES'-GFP
7. RNA 無添加

図9



SEQUENCE LISTING

<110> Japan as represented by director-general of National Institute of Sericultural and Entomological Science Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

<120> Novel tertiary structure having ability to accelerate translation activity

<130> GP01-1004

<150> JP P2001-016746

<151> 2001-01-25

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 188

<212> RNA

<213> Plautia stali intestine virus

<400> 1

gacuauguga ucuuauuaaa auuagguuuaa auuucgaggu uaaaaauagu uuuuaauauug 60

cuauagucuu agaggucuug uauauuuuaa cuuaccacac aagaugggacc ggagcagccc 120

uccaaauaucu aguguacccu cgugcucgcu caaacauuaa gugguguugu gcgaaaagaa 180

ucucacuu

188

<210> 2

<211> 187

<212> RNA

<213> Himetobi P virus

<400> 2

gaaaaugugu gaucugauua gaaguaagaa aauuccuagu uauaaauuuuu uuaauacugc 60
uacauuuuuua agacccuuag uuauuuagcu uuaccgccc ggauggggug cagcguuccu 120
gcaauaucca gggcaccuag gugcagccuu guaguuuuag uggacuuuuag gcuaaagaau 180
uucacua 187

<210> 3

<211> 189

<212> RNA

<213> Drosophila C virus

<400> 3

guuaagaugu gaucuugcuu ccuuauacaa uuuugagagg uuaauaagaa ggaaguagug 60
cuaucuuuaau aauuagguua acuauuuagu uuuacuguuuc aggaugccua uuggcagccc 120
cauaauaucc aggacacccu cucugcucu uauauggauua gguugucuuu uagaauaaga 180
aaaaaaccu 189

<210> 4

<211> 188

<212> RNA

<213> Cricket paralysis virus

<400> 4

caaaaaugug aucuugcuiug uaaaauacaau uuugagaggua uaauaaaaa caaguagugc 60
uauuuuuugua uuuaggguuag cuauuuagcu uuacguucca ggaugccuag uggcagcccc 120
acaauaucca ggaagccuc ucugcgguuu uucagauuag guagucgaaa aaccuaagaa 180
auuuuaccu

188

<210> 5

<211> 186

<212> RNA

<213> Triatoma virus

<400> 5

uugacuaugu gaucuugcuu ucguauaaaa aucuguacau aaaagucgaa aguauugcua 60
uaguuaaggu ugcgcuugcc uauuuaggca uacuucucag gauggcgcgu ugcaguccaa 120
caagauccag ggacuguaca gaaauuuuccu auaccucgag ucggguuugg aaucuaaggu 180
ugacuc

186

<210> 6

<211> 190

<212> RNA

<213> Black queen-cell virus

<400> 6

ccaacaaugu gaucuugcuu gcggaggcaa aauuugcaca guauaaaauc ugcaaguagu 60
gcuauuguug gaaucacccgu accuauuuag guuuacgcuc caagaucggu ggauagcagc 120
ccuaucuaaa ucuaggagaa cugugcuaug uuuagaagau uagguagucu cuaaacagaa 180
caauuuaccu 190

<210> 7

<211> 175

<212> RNA

<213> *Rhopalosiphum padi* virus

<400> 7

aguguugugu gaucuugcgc gauaaauugcu gacgugaaaa cguugcguau ugcuacaaca 60
cuugguuuagc uauuuagcuu uacuaaucaa gacgcccucg ugcagcccac aaaagucuag 120
auacgucaca ggagagcaua cgcuaggucg cguugacuau ccuuaauauau gaccu 175

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/11, C12N 15/86, C12P 21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/11, C12N 15/86, C12P 21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. Sasaki et al., "Translation Initiation at the CUU Codon Is Mediated by the Internal Ribosome Entry Site of an Insect Picorna-Like Virus In Vitro" J. Virol. Vol.73 (1999) pp.1219-1226	1-11
A	J. Sasaki et al., "Methionine--independent initiation of translation in the capsid protein of an insect RNA virus" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol.97 (2000) pp.1512-1515	1-11

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
01 May, 2001 (01.05.01)Date of mailing of the international search report
05 June, 2001 (05.06.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/11, C12N 15/86, C12P 21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/11, C12N 15/86, C12P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. Sasaki et al. "Translation Initiation at the CUU Codon Is Mediated by the Internal Ribosome Entry Site of an Insect Picorna-Like Virus In Vitro" J. Virol. 第73巻 (1999) p. 1219-1226	1-11
A	J. Sasaki et al. "Methionine-independent initiation of translation in the capsid protein of an insect RNA virus" Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 第97巻 (2000) p. 1512-1515	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.05.01

国際調査報告の発送日

05.06.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

印

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448